



V Olomouci 10. ledna 2020

Oponentský posudek diplomové práce Bc. Daniely Stachové
Metabolismus kryoprotektantů hmyzu: transkriptomická analýza pomocí RT-qPCR

Předložená diplomová práce se zaměřuje na studium metabolismu nízkomolekulárních látek, které mají význam pro přežití hmyzu nebo jeho vývojových stádií během chladových nebo dokonce mrazových podmínek.

Zpracovaná literární rešerše je čtivá, její text je logicky a strukturovaně staven. Nesprávné psaní zkráceného latinského jména studovaného organismu *C. costata*, které je v textu uvedeno jako „C.Costata“, což lze považovat za formální chybu, se bohužel se vyskytuje opakovaně na více místech práce. V práci uvedený výčet aktuálních poznatků o diapauze a chladové odolnosti umožňuje čtenáři zorientovat se v biologické podstatě této problematiky. S ohledem na název a zaměření práce v teoretické části postrádám poznatky z transkriptomických studií na tomto nebo fylogeneticky příbuzných organismech.

- Na str. 4. se píše o hexamerických proteinech jako energetické rezervě, může autorka vysvětlit, o jaké proteiny jde? Případně i jejich názvy, pokud jsou známy?
- Na str. 7 autorka zmiňuje problematiku depolymerace proteinů za nízkých teplot (-15 °C) či dokonce denaturaci jejich nativní struktury. Je tedy možné skladovat například enzymy v mrazáku při -80°C v laboratoři? Dojde k renaturaci proteinu po jeho rozmrazení na laboratorní teplotu? U zmíněného faktu je také uvedena citace Privalov (1990), v kterých částech článku se uvedená fakta nacházejí?

- Na str. 16 dole se zmiňují maxima koncentrace látek, které larvy akumulují, např. prolin 313 mmol/kg, glutamin 55 mmol/kg, přičemž údaje dosud nebyly publikovány. Jsou tyto jednotky správné? Je opravdu uvedené molární množství na kilogram?

Navazující kapitola 4. Materiál a metodika začíná podkapitolou 4.1. Metabolomická analýza. Tuto podkapitolu by bylo vhodnější zařadit k literárnímu přehledu včetně výsledků, které dle věty na str. 21 dělal školitel („Až potud jsem postupovala ve své práci pod přímým dohledem školitele a následující kroky (od odebrání vzorků aklimovaných larev) jsem již provedla sama.“). V druhém odstavci na straně 21 autorka popisuje své vlastní výsledky vyhledávání v databázích, avšak bioinformatická analýza (vyhledávání, použití BLAST, kritéria apod.) není v části metod popsána. V této formě, jak je nyní kapitola zpracována, se do kapitoly 4. Materiál a metodika tematicky nehodí, protože jde de facto o přehled poznatků k dané problematice. V této kapitole je navíc i uvedena Tab. II (str. 21), která je souhrnem primerů používaných dále při měření genové exprese, tabulka je printscreenem z tabulkového editoru, chybí jí kvalitní popis sloupců a má nízké rozlišení. Tab. II by se mnohem více hodila k postupu měření relativní exprese genů.

- V Tab I (str. 20) je vlevo v jakési „legendě“ uvedeno: „metabolites LC/GC peak area“, ovšem na str. 19 se píše, že metabolomická analýza byla provedena pomocí ESI-MS se separací na HILIC koloně, o plynové chromatografii není v metodice ani zmínka, může to studentka vysvětlit? Které metabolity byly stanoveny LG a které GC separační metodou?

V další navazující kapitole 4.2. Laboratorní aklimace larev jsou uvedena dvě schémata, která sice pomáhají čtenáři zorientovat se v designu experimentu, nicméně do diplomové práce by jistě bylo vhodnější schémata překreslit ve vhodném softwaru než vkládat fotografii poměrně jednoduchého náčrtu. Ruční náčrty patří v době počítačů do laboratorního deníku nebo do jiných pracovních poznámek.

Kapitola 4.3. Měření relativní četnosti mRNA transkriptů obsahuje postup zpracování vzorků larev až po finální měření relativní exprese. Tato část by měla být napsána tak, aby měření mohl kdokoliv zopakovat, proto bych zde měl několik dotazů a komentářů:

- Str. 24 bod 18: dle postupu by mělo zbývat 50 μ L po měření na NanoDropu, ovšem kde má pracovník toto množství vzít, když byl pelet RNA rozpuštěn jen ve 12 μ L vody (viz bod 17) a po měření na NanoDropu by logicky mělo zbývat jen 10 μ L? V témže bodě se místo písmena „ μ “ používá zjednodušený zápis

písmeno „u“, které se více hodí do pracovních textů než do finální publikace, kterou je i diplomová práce.

- Str. 24 bod 2 dole: Bylo smícháno 5 μ L vzorku, který by měl obsahovat 5 μ g tRNA, kde se v postupu izoluje transferová tRNA (tRNA je běžná zkratka pro transferovou RNA v molekulární biologii), co se skrývá pod zkratkou MM? Proč není tato zkratka uvedena?
- Co je to DEPC voda a jaký je rozdíl mezi DEPC vodou a sterilní vodou používanou při měření relativní exprese?

Dle běžně používaného značení chemikálií v kitech bych předpokládal, že MM 19x je 19x ředěný Master mix, ovšem zde se evidentně myslí premix připravený pro 19 reakcí, doporučuji používat jiné značení, takovéto je matoucí a může vést k chybám.

- Na str. 26 se píše: „Během reverzní transkripce byla získána mRNA (z celkové RNA, tedy tRNA) pomocí Oligo(dT) 23 anchored primer. mRNA byla současně přepsána díky enzymu Superscript III na cDNA, mající funkci templátu pro PCR polymerázu.“ Může autorka vysvětlit pojmy mRNA, tRNA, význam primerů používaných při reverzní transkripci, princip přepisu RNA do cDNA a význam primerů při polymerázové řetězové reakci?
- Na str. 28 je uveden cyklus pro qPCR, dle zapsaného formátu proběhl jen jeden cyklus qPCR, obvykle se používá 35 – 40 cyklů, kolik cyklů se provedlo zde a které dílčí části cyklu byly periodicky opakovány?

Dále v textu práce navazuje kapitola 5. Výsledky

- Experimentální část obsahuje výsledky sledování exprese 15 genů zájmu, avšak ve třetím odstavci (str. 29) se píše, že „jsme pracovali s velkým množstvím různých sekvencí (řádově stovky...)“, rád bych se tedy zeptal, proč nejsou v práci uvedeny i výsledky pro ostatní geny? Na základě čeho byla stanovena arbitrární účinnost primerů na 1,85? Proč ne třeba 1,9 nebo 2,0?
- Dále je uvedena rovnice výpočtu relativní exprese, jak se však do výpočtu zahrnuje více referenčních genů? Uvedený vzorec je jen pro jeden referenční gen, v práci však byly použity 4 referenční geny.
- Pro každou RT-qPCR reakci bylo použito 5 mg RNA...(str. 29 dole), je toto množství určité ve správných jednotkách? Běžně používané protokoly si vystačí řádově s jednotkami μ g RNA.

Dále jsou v práci uvedeny výsledky relativní exprese studovaných genů, ovšem tabulky a grafy jsou opět kopírovány z tabulkového editoru bez jakékoliv další úpravy, tabulky jsou velmi špatně čitelné a zároveň jsou spíše kopií z laboratorního deníku než zpracovanými

Mgr. Jiří Danihlik, Ph.D., Katedra biochemie

Přirodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Šlechtitelů 27 | 783 71 Olomouc | T: +420585 634 920, M: +420 724 758 774

jiri.danihlik@upol.cz

výsledky pro diplomovou práci. Autorka uvádí, že používala 4 referenční geny (housekeeping geny či provozní geny), tabulka tyto data vůbec neobsahuje, hodnoty CT1 a CT2 pro referenční geny obsahují v jednom řádku stejná čísla – jaké to má vysvětlení? Jaký význam má sloupec Initial value? K čemu slouží níže uvedený sloupcový graf? Proč nejsou popsány osy x a y na sloupcovém grafu? Jaká má smysl počítat průměr ze sloupce CT1 a CT2 pro geny zájmu a pro referenční geny? Proč nejsou čísla v tabulce zarovnána na stejný počet desetinných míst? Co znamenají sloupce pro „normalized results“, k čemu byly tyto výsledky normalizovány? Popis pod tabulkou a grafem je také poněkud vágní: „tabulka a graf s výsledky pro XXX“, např. str. 30, 32 atd.).

Na navazující straně (např. 31, 33, 35 atd.) jsou výsledky v tabulce, která nemá popis kromě „copy for heat map“ – k čemu ta tabulka je? Jak souvisí s grafy níže? Proč jsou čísla v tabulce na 10 desetinných míst? Popis grafů, resp. výstupů z PCR cykléru také nejsou vhodně popsány: hodnoty ddct vůbec nejsou z horního grafu patrné a tento graf je prakticky zbytečné uvádět ve zpracovaných výsledcích, neboť přesné hodnoty jsou uvedeny v dřívější tabulce, takže jde o opakování téhož výsledku. Užitečný výstup je z „melting křivek“, ovšem bez dalšího komentáře, snad jen, že pík s teplotou tání, např. 80,5 °C (str. 31) – co tento výsledek znamená v praxi? Jak je možné, že u všech genů vyšel stejný výsledek, tj. 80,5 °C?

Na str. 60 je hned na začátku uveden Obr. 35, avšak jde o tabulku, navíc v popisu se píše, že v tabulce jsou průměrné ddct hodnoty pro studované geny, čísla v tabulce však těmto hodnotám neodpovídají. Co tedy hodnoty v tabulce ukazují?

V navazujícím Obr. 36 (lépe řečeno však tabulce) je uveden výčet metabolitů s čísly, která vůbec nejsou vysvětlena, není jasné, co čísla znamenají, také není vysvětleno vynesení jako log2-fold vpravo na obrázku – co to znamená? K čemu se výsledek vztahuje?

Na str. 61 je v tabulce 37 (autorkou označený za Obr. 37) nahoře uvedena totožná tabulka jako na obr. 36, jde o duplicitní tabulky; níže uvedená tabulka na obr. 37 však není jasně popsána a je pro čtenáře neuchopitelná.

Na str. 62 se v popisu Obr. 38 píše, že schéma bylo vytvořeno na základě dat z relativních četností. O jaká data se jedná – v jakých tabulkách je může čtenář nalézt? Jak se data z expresí proměnila ve schéma, které je totožné se schématem na str. 19? Co znamenají barevně odlišené šipky se čtenář dozví až z obr. 40 na další straně. Proč nejsou porovnávána i další vývojová stadia v podobných schématech? Zde je nejspíše jen SD10 vs. SD3 a SDA10 vs. SD3.

V celkovém souhrnu lze hodnotit, že studentka provedla ucelenou studii genové transkripce na zvoleném modelu, příslušné výsledky však nejsou řádně popsány, vyhodnoceny ani komentovány. Navrhují, aby hodnotící komise zvažila na základě

Mgr. Jiří Daníhlík, Ph.D., Katedra biochemie

Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Šlechtitelů 27 | 783 71 Olomouc | T: +420585 634 920, M: +420 724 758 774

jiri.danihlik@upol.cz

předložené práce a samotné obhajoby požadovat po autorce přepracování experimentální části včetně přesného a formálně správného popisu metod i výsledkové části s grafy a tabulkami ve formě errata tak, aby výsledky byly v přehledné, formálně správné a strukturované formě.

Práci doporučuji k obhajobě.

Mgr. Jiří Danihlík, Ph.D.

10 -01- 2020

Katedra biochemie PřF UP v Olomouci

Katedra BIOCHEMIE
Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc
<http://biochemie.upol.cz>

